热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛营养物质代谢和瘤胃发酵的影响

杨春涛[1] 刁其玉[1] 曲培滨[1] 司丙文[1] 马俊南[1] 周玉财[2] 屠 焰[1*]

（1.中国农业科学院饲料研究所，奶牛营养学北京市重点实验室，北京 100081；2.首农辛普劳（北京）农业科技有限公司，北京 100081）

摘 要：本文旨在研究饲粮中添加热带假丝酵母菌（CT）与桑叶黄酮（MLF）对断奶前后犊牛能量与氮代谢、瘤胃微生物蛋白合成以及瘤胃发酵的影响。选取（20±2）日龄中国荷斯坦公犊牛 48 头，随机分为 4 组，对照组（CON）饲喂基础饲粮，断奶前为代乳品和开食料，断奶后为开食料；CT 组在基础饲粮中添加 CT；MLF 组添加 MLF；CM 组添加 CT 和 MLF。犊牛于 56 日龄断奶（代乳品），试验期 60 d。分别于犊牛 28、42、56 和 80 日龄采集瘤胃液，35 和 63 日龄进行消化代谢试验。结果表明：与 CT 组相比，CM 组犊牛断奶前代谢能显著提高（$P<0.05$），较 CON 组，断奶后 CM 组氮利用率显著提高（$P<0.05$）；断奶前 MLF 组较 CON 和 CT 组氮的生物学价值显著提高（$P<0.05$）。与 CON 组相比，CT 组显著提高了 28~80 日龄瘤胃液 pH 和 56、80 日龄瘤胃液微生物蛋白含量（$P<0.05$），CT、MLF 和 CM 组瘤胃液氨态氮浓度无显著变化（$P>0.05$）；与 CON 组相比，56 日龄 MLF 组总挥发性脂肪酸浓度和丁酸含量显著提高（$P<0.05$）；42 日龄乙酸/丙酸 CT 和 MLF 组较 CON 组有提高的趋势（$P=0.090$），各组间乙酸和戊酸含量无显著差异（$P>0.05$）。结果提示，饲粮添加 CT 有助于改善断奶前犊牛瘤胃液 pH 和促进瘤胃微生物蛋白的合成；添加 CT 和 MLF 有助于提高断奶前犊牛饲粮代谢能和氮的生物学价值，提高断奶后犊牛总能代谢率和氮的利用率，降低粪能和总排出氮量，同时具有改善瘤胃发酵的作用，并且 CT 与 MLF 联合使用效果优于单一添加。

关键词：犊牛；热带假丝酵母菌；桑叶黄酮；微生物蛋白；营养物质代谢；瘤胃发酵

中图分类号：S816.7；S823

犊牛从出生到适应外界环境，再经历断奶，短时间内在免疫机能和营养物质消化代谢等

收稿日期：2015-07-14

基金项目：奶牛产业技术体系北京市创新团队；国家科技支撑计划课题“华北农区及北方大城市奶牛健康养殖生产技术集成及产业化示范”（2012BAD12B06）

作者简介：杨春涛（1987-），男，河北邢台人，硕士，研究方向为反刍动物营养。E-mail: yangchuntao0808@163.com

*通信作者：屠 焰，研究员，硕士生导师，E-mail: tuyan@caas.cn

方面发生了巨大改变[1]。其瘤胃健康发育对营养物质的吸收利用以及成年后生产性能的发挥具有重要的意义。酵母益生类物质作为反刍动物瘤胃发酵的天然调控剂，不仅可以促进瘤胃发育、维持瘤胃液 pH 稳定、改善瘤胃内环境，还可以提高营养物质利用率[2]。其中热带假丝酵母菌（*Candida tropicalis*，CT）作为反刍动物饲料添加剂在降解饲粮纤维方面具有巨大的潜力[3]，在瘤胃中通过激活纤维分解菌，增加乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸（VFA）含量，为反刍动物提供能量，同时还可以提高饲粮的体外干物质(DM)消化率[4]。黄酮类化合物作为植物次级代谢产物，广泛存在于大多数高等植物茎叶中[5]，其通过调节一些代谢关键酶的活性和表达，进而调节脂类和碳水化合物的代谢[6]，提高营养物质的吸收利用率。然而，单独使用酵母制剂在反刍动物中的应用效果并不理想。在一些研究中使用活性酵母或者酵母培养物改善了动物生产性能，但在另一些研究中活性酵母并没有改善动物生产性能，甚至使用酵母培养物制剂后导致生产性能降低。Timmerman 等[7]研究发现，由于微生物及产生的代谢产物间潜在的协同作用，不同菌属益生菌或益生菌与天然植物提取物联合使用有可能比单一菌株益生菌更有效。因此，本试验在犊牛饲粮中添加 CT 与桑叶黄酮（mulberry leaf flavonoids，MLF），旨在探讨 CT 与 MLF 及其两者复合物的相互作用对断奶前后犊牛能量和氮代谢、瘤胃微生物蛋白(MCP)合成以及瘤胃发酵的影响，为益生菌与植物提取物在犊牛培育中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于 2014 年 8 月—2014 年 11 月在北京市三元绿荷西郊一场进行。试验期 60 d，其中预试期 7 d，正试期 53 d。

1.2 试验设计与饲粮

本试验采用单因素随机设计，共分 4 组。对照组（CON）饲喂基础饲粮；CT 组在基础饲粮中添加 CT；MLF 组在基础饲粮中添加 MLF；CM 组则在基础饲粮添加 CT 及 MLF。CT 制剂（活菌含量 5×10^9 CFU/g；北京华农生物工程有限公司生产）添加总量根据 Chung 等[8]研究结果为每头犊牛 5×10^9 CFU/d。MLF（黄酮含量 50 mg/g；提取工艺：桑叶经物理破碎、超声波提取、抽滤、减压浓缩、真空干燥成粉末；西安飞达生物技术有限公司生产）添加总量根据陈丹丹等[9]研究结果为每头 3 g/d。基础饲粮为不含抗生素和微生物制剂的代乳

品和开食料，其中代乳品是依照国家发明专利 CN 02128844.5 由北京精准动物营养研究中心生产提供。基础饲粮营养水平见表 1。

表 1　开食料组成及营养水平、代乳品营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the starter, nutrient levels of the milk replacer (air-dry basis)　　%

项目 Items	开食料 Starter	代乳品 Milk replacer
玉米 Corn	20.00	
膨化玉米 Extrude corn	22.90	
豆粕 Soybean meal	20.00	
膨化大豆 Extruded soybean	18.00	
乳清粉 Dried whey	5.00	
小麦麸 Wheat bran	10.00	
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.80	
石粉 Limestone	1.80	
食盐 NaCl	0.50	
预混料 Premix	1.00	
合计 Total	100.00	
营养水平 Nutrient levels		
干物质 DM	85.36	95.36
有机物 OM	92.21	94.85
粗蛋白质 CP	19.08	24.27
粗脂肪 EE	2.21	12.85
中性洗涤纤维 NDF	18.59	4.02
酸性洗涤纤维 ADF	10.65	2.11
钙 Ca	1.09	1.07
磷 P	0.47	0.48
总能 GE/(MJ/kg)	15.45	19.86

预混料为每千克开食料提供 Premix provided the following per kg of the starter：VA 15 000 IU，VD 5 000 IU，VE 50 mg，Fe 90 mg，Cu 12.5 mg，Mn 30 mg，Zn 90 mg，Se 0.3 mg，I 1.0 mg，Co 0.5 mg。

1.3　试验动物与饲养管理

选用自然分娩、初生重（40±2.5） kg、饲喂足量初乳及鲜乳的（20±2）日龄中国荷斯坦公犊牛 48 头。随机分为 4 个组，每组 12 头。犊牛 21～27 日龄为试验预试期，进行代乳品过渡，27 日龄时全部换成代乳品。代乳品用煮沸后冷却到 50～60 ℃的热水按 DM 占 12.5%比例冲泡成乳液，待温度降至 40 ℃左右饲喂犊牛，每天分 2 次饲喂（08:00 和 15:00），每头犊牛每天饲喂量为体重的 12%（每 2 周根据体重增长调整 1 次）。50～56 日龄进行断代乳品过渡，56 日龄时完全断代乳品。断奶前后将所需添加的制剂在每日晨饲时分别添加到

代乳品乳液或开食料中进行。试验期开食料自由采食，并保证干净、充足水源。犊牛采用犊牛岛单独饲养，每个犊牛岛占地面积为 1.6 m×3.6 m。

1.4　样品采集与测定

1.4.1　饲料样品

试验过程中采集具有代表性的代乳品、开食料样品，依照 AOAC（2000）[10]的方法测定其营养成分含量，其中：总能（GE）以 PARR-6400 全自动氧弹量热仪测定；粗蛋白质（CP）含量以 KDY-9830 全自动凯氏定氮仪测定；粗脂肪（EE）含量采用 ANKOM-XT15i 全自动脂肪分析仪测定；同时测定样品中有机物（OM）、中性洗涤纤维（NDF）、酸性洗涤纤维（ADF）、钙（Ca）和磷（P）含量。

1.4.2　消化代谢试验样品

每组选取接近平均体重 4 头健康犊牛，于 35 和 63 日龄利用消化代谢笼（专利号 ZL 201420358189.7）采取全收粪尿法分别进行犊牛断奶前与断奶后消化代谢试验。试验期均为 7 d，其中预试期 3 d，正试期 4 d，记录每头犊牛每天实际采食量、排粪量和排尿量。正试期连续采集日粪便总量的 10%作为混合样品，每 100 g 鲜粪加入 10%的稀盐酸 10 mL 固氮。连续收集每头犊牛日排尿量的 1%作为混合样品，用 10%稀盐酸调整尿样使 pH≤3。正试期每天采集具有代表性的代乳品和开食料样品。收集的饲料、粪、尿样品于-20 ℃冷冻保存待测。

代乳品、开食料和粪样中 DM、GE 和 CP 含量以及尿能与尿氮测定参考 AOAC（2000）中方法进行测定[10]，试验仪器如上所述。计算饲粮消化能、代谢能、GE 表观消化率、GE 代谢率和消化能代谢率，公式如下：

消化能=摄入 GE－粪能；

代谢能=摄入 GE－粪能－尿能－甲烷能；

GE 表观消化率=消化能/摄入 GE；

GE 代谢率=代谢能/摄入 GE；

消化能代谢率=代谢能/消化能。

式中：甲烷能按 GE 8%计算[11]。

1.4.3　瘤胃液样品

每组选取接近组平均体重的 4 头犊牛，分别于 28、42、56 和 80 日龄晨饲前，采用灭菌口腔导管采集瘤胃内容物 100 mL，4 层纱布过滤后，立即用便携式 pH 计（testo-206-pH2）测定瘤胃液 pH，然后分装于 10 mL 灭菌离心管中，放入液氮带回实验室，-80 ℃保存待测。

瘤胃液 4 ℃解冻，取上清液 1 mL，加 25%偏磷酸溶液 0.3 mL，振荡 3～5 s 混匀后，静置 30 min，15 000×*g* 离心 15 min 后，将上清液分装 0.5 mL。瘤胃液中 VFA 含量参照 Cao 等[12]方法测定；氨态氮（NH_3-N）浓度采用靛酚比色法[13]测定；MCP 含量参照 Makkar 等[14]的方法测定。

1.5　统计分析

以 SAS 9.2 软件进行统计。除消化代谢试验中能量与氮的数据利用 one-way ANOVA 模型进行分析外，其他数据利用 MIXED 模型进行分析。差异显著（$P<0.05$）时采用最小显著差数法（least significant difference，LSD）进行比较。

one-way ANOVA 模型为：

$$Y_{ij}=\mu+T_i+\varepsilon_{ij}。$$

式中：μ 为平均值；T 为处理（i=1、2、3、4），固定效应；ε 为残差；j=1…16。

MIXED 模型为：

$$Y_{ijk}=\mu+T_i+D_j+TD_{ij}+C(T)_{ik}+\varepsilon_{ijk}。$$

式中：μ 为均值；T 为处理（i=1、2、3、4），固定效应；D 为日龄（j=28、42、56、80），固定效应；C 为犊牛（k=1…48），随机效应；ε 为残差。

2　结果与分析

2.1　CT 与 MLF 对犊牛饲粮采食量的影响

由表 2 可知，断奶前饲粮添加 CT 与 MLF 有提高总 DM 采食量的趋势（P=0.086），CM 组开食料采食量显著高于 CON 组（$P<0.05$）。代乳品采食量和断奶后开食料采食量组间无显著差异（$P>0.05$）。

表 2　热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛采食量的影响（干物质基础）

Table 2　Effects of *Candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on feed intake of calves (DM basis, *n*=16)

g/d

项目 Items	组别 Groups	SEM	*P* 值 *P*-value

	CON	CT	MLF	CM		
断奶前犊牛 Pre-weaning calves						
总干物质采食量 Total DM intake	775.94	805.30	842.68	1 058.98	49.963	0.086
代乳品采食量 Milk replacer intake	516.21	503.64	514.43	508.22	36.933	0.638
开食料采食量 Starter intake	259.73^{b}	301.66^{b}	328.25^{b}	550.76^{a}	40.509	0.029
断奶后犊牛 Post-weaning calves						
开食料采食量 Starter intake	1 774.49	1 897.68	1 525.82	1 958.97	95.469	0.604

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(*P*>0.05)，不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

2.2 CT 与 MLF 对犊牛能量消化代谢的影响

由表 3 可知，饲粮添加 CT 与 MLF 在有提高断奶前犊牛摄入 GE（*P*=0.067）和消化能（*P*=0.089）的趋势，同时 CM 组代谢能显著高于 CON 组（*P*<0.05）。与 CON 组相比，断奶后 CM 组通过降低粪能[差异显著（*P*<0.05）]显著提高了 GE 代谢率（*P*<0.05），而 CT 组与 MLF 组间 GE 代谢率无显著差异（*P*>0.05）。试验全期饲粮添加 CT 与 MLF 对犊牛尿能无显著影响（*P*>0.05）。

表 3 热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛能量消化代谢的影响（干物质基础）

Table 3 Effects of *Candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on energy digestion and metabolism of calves (DM basis, *n*=6)

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value
	CON	CT	MLF	CM		
断奶前犊牛 Pre-weaning calves						
摄入总能 Intake gross energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.69	0.71	0.74	0.87	0.037	0.067
粪能 Fecal energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.14	0.15	0.15	0.18	0.008	0.315
尿能 Urine energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.07	0.08	0.08	0.07	0.004	0.591
消化能 Digestible energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.54	0.56	0.59	0.69	0.027	0.089
代谢能 Metabolizable energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.42^{b}	0.42^{b}	0.45^{ab}	0.55^{a}	0.021	0.031
总能表观消化率 Apparent digestibility of GE/%	79.22	78.61	77.70	78.99	1.201	0.796
总能代谢率 Metabolizability of GE/%	60.25	59.21	58.25	62.77	1.580	0.536
消化能代谢率 Metabolizability of DE/%	76.02	75.26	74.49	79.42	1.161	0.123
断奶后犊牛 Post-weaning calves						
摄入总能 Intake gross energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.99	1.05	0.85	1.11	0.058	0.466
粪能 Fecal energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.24^{a}	0.23^{a}	0.18^{b}	0.18^{b}	0.031	0.023
尿能 Urine energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.08	0.07	0.07	0.06	0.004	0.229
消化能 Digestible energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.75	0.82	0.67	0.93	0.049	0.293

代谢能 Metabolizable energy/[MJ/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.59	0.67	0.54	0.78	0.043	0.217
总能表观消化率 Apparent digestibility of GE/%	75.84	78.47	78.48	84.09	1.201	0.080
总能代谢率 Metabolizability of GE/%	59.35[b]	63.72[ab]	62.30[b]	70.52[a]	1.468	0.028
消化能代谢率 Metabolizability of DE/%	78.28	81.23	79.14	83.90	0.856	0.074

2.3 CT 与 MLF 对犊牛氮消化代谢的影响

由表 4 可知，犊牛断奶前饲粮添加 CT 与 MLF 表现出提高沉积氮（*P*=0.058）和氮利用率(*P*=0.062）的趋势，同时 MLF 组较 CON 和 CT 组显著提高了氮的生物学价值（*P*<0.05）。断奶后通过降低尿氮排出量及总排出氮量，CT 和 CM 组较其他组显著提高了氮利用率（*P*<0.05）；饲粮添加 CT 和 MLF 表现出提高沉积氮（*P*=0.076）和氮的生物学价值(*P*=0.068）的趋势。然而，添加 CT 与 MLF 对断奶前后犊牛摄入氮和粪氮排出量无显著影响（*P*>0.05）。

表 4 热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛氮消化代谢的影响（干物质基础）

Table 4 Effects of *Candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on nitrogen digestion and metabolism of calves (DM basis, *n*=6)

项目 Items	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value
	CON	CT	MLF	CM		
断奶前犊牛 Pre-weaning calves						
摄入氮 Intake N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	1.34	1.39	1.45	1.72	0.082	0.229
粪氮 Fecal N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.48	0.51	0.49	0.55	0.020	0.642
尿氮 Urine N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.44	0.44	0.41	0.47	0.019	0.463
总排出氮 Total excrete N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.92	0.96	0.90	1.02	0.030	0.344
吸收氮 Absorbed N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.87	0.87	0.96	1.17	0.075	0.145
沉积氮 Retained N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.42	0.43	0.55	0.70	0.048	0.058
氮表观消化率 Apparent digestibility of N/%	63.96	62.39	63.60	67.62	1.831	0.714
氮利用率 Utilization of N/%	30.44	29.44	33.12	40.30	2.323	0.062
氮的生物学价值 Biological value of N/%	47.16[b]	46.34[b]	62.55[a]	59.31[ab]	2.420	0.043
断奶后犊牛 Post-weaning calves						
摄入氮 Intake N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	1.95	2.07	1.67	2.19	0.115	0.466
粪氮 Fecal N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.43	0.42	0.32	0.35	0.029	0.247
尿氮 Urine N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.46	0.37	0.35	0.30	0.024	0.096
总排出氮 Total excrete N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	0.89[a]	0.79[a]	0.67[b]	0.65[b]	0.037	0.016
吸收氮 Absorbed N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	1.52	1.65	1.36	1.85	0.096	0.345
沉积氮 Retained N/[g/(kg $W^{0.75}$ • d)]	1.05	1.28	1.00	1.54	0.106	0.076
氮表观消化率 Apparent digestibility of N/%	77.46	80.26	80.19	84.35	1.086	0.272
氮利用率 Utilization of N/%	49.88[b]	61.45[a]	58.66[ab]	70.12[a]	2.307	0.012
氮的生物学价值 Biological value of N/%	64.02	76.88	72.89	83.12	2.789	0.068

2.4 CT 与 MLF 对犊牛瘤胃液 pH、NH_3-N 浓度和 MCP 含量的影响

由表 5 可知，饲粮添加 CT 提高了犊牛瘤胃液 pH，其中 28、42 日龄 CT 组分别显著高

于 CM 与 MLF 组（P<0.05）。断奶前后添加 CT 与 MLF 对犊牛瘤胃液 NH_3-N 浓度无显著影响（P>0.05）。随着犊牛日龄增加瘤胃液 MCP 含量显著提高（P<0.05），断奶后不同组表现出差异，其中 56、80 日龄 CT 组、80 日龄 MLF 组均显著高于 CON 组（P<0.05）。

表 5　热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛瘤胃液 pH、NH_3-N 浓度和 MCP 含量的影响

Table 5　Effects of *Candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on pH, NH_3-N concentration and MCP content in rumen fluid of calves (n=6)

项目 Items	日龄 Days of age	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value		
		CON	CT	MLF	CM		组别 Group	日龄 Days of age	组别×日龄 Group×days of age
pH	28~80	6.08^{b}	6.71^{a}	5.93^{b}	6.14^{b}	0.094	0.030	0.097	0.304
	28	5.91^{ab}	7.05^{a}	6.35^{ab}	5.61^{b}	0.218	0.021		
	42	6.25^{ab}	6.93^{a}	5.81^{b}	6.41^{ab}	0.182	0.047		
	56	6.22	5.95	5.48	5.83	0.148	0.113		
	80	5.97	6.89	6.08	6.70	0.091	0.051		
氨态氮 NH_3-N/(mmol/L)	28~80	12.43	11.74	11.85	13.22	0.628	0.259	0.023	0.469
	28	15.92	14.07	10.89	12.73	2.527	0.437		
	42	11.15	13.58	16.03	16.55	2.375	0.138		
	56	6.27	5.59	6.30	8.19	1.036	0.736		
	80	16.37	13.73	14.20	15.42	1.698	0.452		
微生物蛋白 MCP/(mg/mL)	28~80	1.43	1.89	1.88	1.75	0.080	0.344	0.024	0.008
	28	0.99	1.31	1.51	1.46	0.098	0.145		
	42	1.38	1.78	1.63	1.74	0.074	0.271		
	56	1.62^{b}	2.01^{a}	1.98^{ab}	1.77^{ab}	0.210	0.018		
	80	1.68^{b}	2.45^{a}	2.43^{a}	1.97^{ab}	0.269	0.009		

2.5　CT 与 MLF 对犊牛瘤胃液 VFA 含量的影响

由表 6 可知，添加 CT 与 MLF 对犊牛瘤胃液 VFA 产生了一定的影响，同时随着犊牛日龄的增加总挥发性脂肪酸（TVFA）浓度和丁酸含量显著提高（P<0.05）。56 日龄 MLF 组 TVFA 浓度显著高于 CON 组（P<0.05），而其他日龄各组间无显著差异（P>0.05）。CT 组显著降低了 42 日龄犊牛瘤胃液丙酸含量（P<0.05），而 MLF 组显著提高了 56 日龄丁酸含量（P<0.05）。从表中还可以看出，42 日龄时 CT 和 MLF 组与 CON 组相比有提高乙酸/丙酸的趋势（P=0.090），然而各组对乙酸和戊酸含量无显著影响（P>0.05）。

表 6　热带假丝酵母菌与桑叶黄酮对犊牛瘤胃液 VFA 含量的影响

Table 6　Effects of *Candida tropicalis* and mulberry leaf flavonoids on VFA contents in rumen fluid of calves (n=6)

项目 Items	日龄 Days of age/d	组别 Groups				SEM	*P* 值 *P*-value		
		CON	CT	MLF	CM		组别 Group	日龄 Days of age	组别×日龄 Group×days of age
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	28~80	64.55	58.45	81.18	66.14	4.357	0.199	0.004	0.537
	28	37.49	23.78	37.64	40.65	5.494	0.167		
	42	57.80	57.78	79.24	61.37	7.806	0.359		
	56	64.14^{b}	71.73^{ab}	111.59^{a}	74.17^{ab}	8.489	0.029		
	80	98.76	80.51	96.22	88.37	4.105	0.143		
乙酸 Acetate/%	28~80	58.69	59.37	56.93	55.88	0.952	0.523	0.117	0.727
	28	63.04	64.57	63.93	57.34	1.771	0.265		
	42	54.20	59.44	58.29	55.91	2.015	0.371		
	56	60.38	60.27	52.59	53.74	1.682	0.134		
	80	57.12	53.20	52.92	56.52	0.872	0.407		
丙酸 Propionate/%	28~80	32.37	27.84	29.63	31.70	0.804	0.260	0.949	0.797
	28	31.18	29.37	29.49	34.67	2.374	0.324		
	42	36.14^{a}	22.95^{b}	28.98^{ab}	31.11^{ab}	2.067	0.020		
	56	30.01	29.91	30.77	31.85	1.483	0.668		
	80	32.17	29.14	29.26	29.18	0.798	0.504		
丁酸 Butyrate/%	28~80	6.42	9.01	10.08	9.16	0.646	0.187	0.028	0.838
	28	4.46	5.86	4.84	5.38	0.483	0.757		
	42	7.43	10.58	8.65	8.37	1.189	0.396		
	56	5.88^{b}	7.80^{ab}	13.48^{a}	11.07^{ab}	1.504	0.028		
	80	7.90	11.78	13.35	11.82	0.987	0.102		
戊酸 Valerate/%	28~80	2.65	2.60	3.14	2.85	0.147	0.287	0.298	0.884
	28	2.51	2.26	2.81	2.16	0.182	0.462		
	42	2.00	2.73	3.43	2.86	0.294	0.109		
	56	3.29	2.16	2.76	3.35	0.296	0.141		
	80	2.80	3.26	3.58	3.02	0.123	0.329		
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	28~80	1.86	2.29	2.14	1.82	0.096	0.314	0.741	0.811
	28	2.05	2.38	2.61	1.72	0.334	0.166		
	42	1.52	2.63	2.34	1.84	0.069	0.090		
	56	2.08	2.28	1.80	1.69	0.159	0.284		
	80	1.80	1.88	1.81	2.04	0.109	0.653		

3 讨　论

3.1 CT 与 MLF 对犊牛能量和氮消化代谢的影响

胃肠道的发育直接影响到动物对营养物质的消化利用。张昌吉等[15]与孙耀贵等[16]分别通过对绵羊和肉鸡研究发现，饲粮添加酵母菌与黄酮类化合物较无添加的对照组具有提高营养物质表观消化率的作用。从本试验可以看出，添加 CT 与 MLF 复合物通过提高断奶前犊牛开食料采食量，增加摄入 GE 从而提高了营养物质的代谢能，而断奶后饲粮添加 MLF 及

其与 CT 的复合物提高了 GE 表观消化率和 GE 代谢率，降低了粪能的排出量。说明饲粮添加 CT 与 MLF 有助于提高哺乳期犊牛食欲、增加 GE 的摄入。代乳品中碳水化合物主要是乳糖、葡萄糖以及半乳糖，而开食料中主要是淀粉，断奶后犊牛饲粮中添加 MLF 及其与 CT 的复合物，可能是通过刺激胃肠道促进消化酶的分泌或提高淀粉酶活性从而提高了碳水化合物的消化吸收[7]，降低了粪能。

对于氮的消化利用从结果中可以看出，饲粮添加 MLF 及其与 CT 的复合物显著提高了断奶前犊牛氮的生物学价值和断奶后氮的利用率。这可能是由于 CT 通过刺激瘤胃多种蛋白质分解菌，更多将饲粮中 CP 降解合成为 MCP[17]，MLF 则通过提高胃肠道消化酶的活性，两者相互作用共同提高了氮的利用率，这与 Lee 等[18]研究结果一致。从本试验还可以看出断奶后（63 日龄）犊牛饲粮添加 MLF 及其与 CT 的复合物降低了总排出氮量（23.49～24.71 g/d），低于 Hill 等[19]的结果（19.3～34.9 g/d；8 周龄），这可能是由于 MLF 与 CT 产生的小肽、氨基酸等多种代谢产物间相互作用[5]，改善了饲粮氨基酸的平衡从而提高了氮利用率减少了粪尿中氮排出。结合能量与氮的消化代谢结果可以发现，CT 与 MLF 联合使用较单独使用表现出明显优势，可能是由于酵母产生的有机酸和维生素等代谢产物与黄酮类化合物相互作用，共同促进了动物机体对能量和氮的利用[20-21]。

3.2　CT 与 MLF 对犊牛瘤胃发酵的影响

反刍动物瘤胃液 pH、NH_3-N 和 VFA 作为发酵的重要指标，具有反映瘤胃功能和瘤胃内环境稳定性的作用[22]。本试验中，饲粮添加 CT 提高了断奶前犊牛瘤胃液 pH，这与 Bayatkouhsar 等[23]利用乳酸杆菌对犊牛瘤胃液 pH 研究的结果一致。瘤胃液 pH 对瘤胃微生物，尤其纤维分解菌具有重要的影响，随着瘤胃液 pH 升高，纤维分解菌活性增强[24]，这对于犊牛瘤胃有益菌群的建立具有重要的作用。瘤胃液 NH_3-N 浓度处于动态变化之中，反映了瘤胃中蛋白质降解与 MCP 合成的动态平衡关系，其中适宜微生物生长繁殖的浓度为 6～30 mg/dL[25]。Anderson 等[26]研究发现，断奶后犊牛瘤胃液 NH_3-N 浓度要显著低于断奶前，本试验也出现相似的结果。可能是由于新生犊牛瘤胃功能发育不全，随着日龄增加动物发育成熟以及微生物菌群逐渐建立，瘤胃微生物在增殖的过程中，将更多的 NH_3-N 转化为 MCP，降低了 NH_3-N 浓度[27]，这也正好解释了随着犊牛日龄的增加瘤胃液 MCP 增加的现象。瘤胃中 MCP 可为反刍动物提供 50%～80%的小肠可吸收蛋白质[28]，其在瘤胃的合成主要与微

生物可利用能量与蛋白质相关，添加 CT 与 MLF 提高了断奶犊牛瘤胃 MCP 的合成，说明 CT 与 MLF 可以促进瘤胃微生物对饲粮中的能量和蛋白质的利用，同样代谢试验结果也证实添加 CT 与 MLF 有助于提高犊牛营养物质消化利用的作用。庞德公等[29]研究结果也表明，饲粮添加产朊假丝酵母对瘤胃液 NH_3-N 浓度无影响的同时，提高了瘤胃微生物对饲料蛋白质利用效率，进而促进瘤胃微生物的生长。

3.3　CT 与 MLF 对犊牛瘤胃发酵产物的影响

VFA 作为反刍动物瘤胃发酵的重要产物，可为反刍动物提供 70%～80%的代谢能。其中乙酸主要为粗饲料发酵产物，主要通过三羧酸循环氧化产生 ATP 用于细胞维持和组织合成[30]；丙酸主要由可溶性碳水化合物发酵产生经瘤胃壁吸收后成为血液葡萄糖合成的主要前体物。从本试验可以发现，随着犊牛日龄的增加瘤胃液 TVFA 浓度显著提高，说明犊牛瘤胃功能逐渐发育完善。饲粮添加 CT、MLF 及两者复合物显著了瘤胃发酵，其中 56 日龄时与 CON 组相比, CT、MLF 及 CM 组 TVFA 浓度分别提高了 11.83%、73.98%和 15.64%，添加 MLF 瘤胃液 TVFA 达到 111.59 mmol/L。这与 Sun 等[22]利用纳豆芽孢杆菌对犊牛研究结果一致，同时 Newbold 等[31]研究也发现对绵羊饲喂植物提取物精油后显著增加了瘤胃液 TVFA 的浓度，然而 Spanghero 等[32]却发现添加植物提取物却降低了瘤胃液 VFA 含量。造成这种差异可能是与所添加的植物提取物类型、剂量以及试验的动物不同有关[33]。添加 CT 通过降低丙酸含量增加了乙酸/丙酸，改善了瘤胃发酵模式。究其原因可能是 CT 在瘤胃内与其他微生物相互作用刺激瘤胃微生物快速繁殖，利用了大量丙酸，这也解释了饲粮中添加 CT 有助于 MCP 合成的现象。从本试验还可以发现，添加 MLF 显著提高了丁酸含量。丁酸对于幼龄反刍动物的瘤胃发育至关重要，不仅可以促进瘤胃上皮细胞增殖和分化，还可以提高胃肠道敏感性和促进肠道蠕动[34]。说明饲粮添加 MLF 有助于断奶前后犊牛瘤胃发育。然而，添加 CT 瘤胃液丁酸含量却无显著变化，这与 Sun 等[22]和丁洪涛等[35]饲粮中分别添加纳豆芽孢杆菌与产朊假丝酵母对瘤胃液丁酸含量均无显著影响的结果相似。

3.4　CT 与 MLF 对犊牛影响的异同

总结上述结果，可以发现饲粮添加 CT 与 MLF 均对犊牛能量和蛋白质的利用产生了积极作用。然而 CT 主要通过利用自身产生的多种代谢产物刺激瘤胃微生物大量生长和繁殖，增加瘤胃 MCP 的含量以及降低丙酸含量，提高瘤胃液 pH、能量与氮的利用率。MLF 作为

雌二醇类似物，通过调节一些代谢关键酶的活性和表达，促进胃肠道消化酶分泌，提高犊牛饲粮能量与蛋白质消化利用率。而 CT 与 MLF 联合使用，则在提高营养物质消化利用和促进瘤胃 MCP 合成与发酵等方面均表现出优势。

4 结 论

① 饲粮添加 CT 有助于改善断奶前犊牛瘤胃液 pH 和促进瘤胃微生物蛋白的合成。

② 添加 CT 和 MLF 有助于提高断奶前犊牛饲粮代谢能和氮的生物学价值，提高断奶后犊牛总能代谢率和氮的利用率，降低粪能和总排出氮量，同时具有改善瘤胃发酵的作用，并且 CT 与 MLF 联合使用效果优于单一添加。

参考文献：

[1] HAMMON H M,STEINHOFF-WAGNER J,SCHÖNHUSEN U,et al.Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf:endocrine changes and responses to milk-born and systemic hormones[J].Domestic Animal Endocrinology,2012,43(2):171–185.

[2] GÜMÜŞ H,ŞEHU A.The usage of yeast and yeast product in ruminant[J].Animal studies and Veterinary Medicine,2012,2(5):5–8.

[3] MARRERO Y,CASTILLO Y,BURROLA-BARRAZA M E,et al.Morphological,biochemical and molecular identification of the yeast *Levica 25*:A Potential Ruminal Microbial Additive[J].Global Veterinaria,2011,7(1):60–65.

[4] MARRERO Y,CASTILLO Y,RUIZ O,et al.Feeding of yeast (*Candida* spp.) improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates[J].Journal of Integrative Agriculture,2015,14(3):514–519.

[5] MACIEJ J,SCHÄFF C T,KANITZ E,et al.Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin[J].Journal of Dairy Science,2015,98(6):3906–3917.

[6] KOBAYASHI Y,MIYAZAWA M,KAMEI A,et al.Ameliorative effects of mulberry (*Morus alba* L.) leaves on hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet:induction of fatty acid oxidation,inhibition of lipogenesis,and suppression of oxidative stress[J].Bioscience,Biotechnology and Biochemistry,2010,74(12):2385–2395.

[7] TIMMERMAN H M,KONING C J M,MULDER L,et al.Monostrain,multistrain and multispecies probiotics-a comparison of functionality and efficacy[J].International Journal of Food Microbiology,2004,96(3):219–233.

[8] CHUNG Y H,WALKER N D,MCGINN S M,et al.Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2011,94(5):2431–2439.

[9] 陈丹丹,屠焰,马涛,等.桑叶黄酮和白藜芦醇对肉羊气体代谢及甲烷排放的影响[J].动物营养学报,2014,26(5):1221–1228.

[10] AOAC.Official methods of analysis[M].17th ed.Gaithersburg,MD:Association of Official Analytical Chemists,2000.

[11] DENG K D,JIANG C G,TU Y,et al.Energy requirements of Dorper crossbred ewe lambs[J].Journal of Animal Science.2014,92(5):2161–2169.

[12] CAO Y C,YANG H J.Ruminal digestibility and fermentation characteristics *in vitro* of fenugreek and alfalfa hay combination with or without the inoculation of *Neocallimastix* sp.YAK11[J].Animal Feed Science and Technology,2011,169(1/2):53–60.

[13] VERDOUW H,VAN ECHTELD C J A,DEKKERS E M J.Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate[J].Water Research,1978,12(6):399–402.

[14] MAKKAR H P S,SHARMA O P,DAWRA R K,et al.Simple determination of microbial protein in rumen liquor[J].Journal of Dairy Science,1982,65(11):2170–2173.

[15] 张昌吉,刘哲,郝正里,等.添加酵母培养物对绵羊全颗粒饲粮中氮消化代谢的影响[J].中国饲料,2007(5):20–23.

[16] 孙耀贵,张向杰,程佳,等.2 种中药成分对肉鸡生产性能、营养物质消化利用率、肠道消化酶活性和肠道菌群的影响[J].中国畜牧兽医,2013,40(4):93–98.

[17] ENJALBERT F,GARRETT J E,MONCOULON R,et al.Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows[J].Animal Feed Science and Technology,1999,76(3/4):195–206.

[18] LEE S S,HA J K,CHENG K J.Influence of an anaerobic fungal culture administration on in

vivo ruminal fermentation and nutrient digestion[J].Animal Feed Science and Technology,2000,88(3/4):201–217.

[19] HILL S R,KNOWLTON K F,DANIELS K M,et al.Effects of milk replacer composition on growth,body composition,and nutrient excretion in preweaned Holstein heifers[J].Journal of Dairy Science,2008,91(8):3145–3155.

[20] CHAUCHEYRAS-DURAND F,DURAND H.Probiotics in animal nutrition and health[J].Beneficial Microbes,2010,1(1):3–9.

[21] BODAS R,PRIETO N,GARCÍA-GONZÁLEZ R,et al.Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites[J].Animal Feed Science and Technology,2012,176(1/2/3/4):78–93.

[22] SUN P,WANG J Q,DENG L F.Effects of *Bacillus subtilis natto* on milk production,rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows[J].Animal,2013,7(2):216–222.

[23] BAYATKOUHSAR J,TAHMASEBI A M,NASERIAN A A,et al.Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance,blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves[J].Animal Feed Science and Technology,2013,186(1/2):1–11.

[24] RUSSELL J B,WILSON D B.Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?[J].Journal of Dairy Science,1996,79(8):1503–1509.

[25] GHORBANI G R,MORGAVI D P,BEAUCHEMIN K A,et al.Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation,blood variables,and the microbial populations of feedlot cattle[J].Journal of Animal Science,2002,80(7):1977–1985.

[26] ANDERSON K L,NAGARAJA T G,MORRILL J L.Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early[J].Journal of Dairy Science,1987,70(5):1000–1005.

[27] CROCKER L M,DEPETERS E J,FADEL J G,et al.Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition[J].Journal of Dairy Science,1998,81(9):2394–2407.

[28] STORM E,ØRSKOV E R.The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants 1.Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms[J].British Journal of

Nutriton,1983,50(2):463–470.

[29] 庞德公,杨红建,曹斌斌,等.高精料全混合日粮中产朊假丝酵母添加水平对体外瘤胃发酵特性和纤维降解的影响[J].动物营养学报,2014(4):940–946.

[30] 杨春涛,司丙文,斯琴巴特尔,等.补饲不同能氮比精料对牧区冬春季羔羊营养物质消化及瘤胃发酵的影响[J].动物营养学报,2014,26(9):2637–2644.

[31] NEWBOLD C J,MCINTOSH F M,WILLIAMS P,et al.Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation[J].Animal Feed Science and Technology,2004,114(1/2/3/4):105–112.

[32] SPANGHERO M,ZANFI C,FABBRO E,et al.Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation[J].Animal Feed Science and Technology,2008,145(1/2/3/4):364–374.

[33] CASTILLEJOS L,CALSAMIGLIA S,FERRET A,et al.Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation[J].Animal Feed Science and Technology,2007,132(3/4):186–201.

[34] CANANI R B,COSTANZO M D,LEONE L,et al.Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases[J].World Journal of Gastroenterology,2011,17(12):1519–1528.

[35] 丁洪涛,刘星,夏冬华,等.产朊假丝酵母对奶牛体外瘤胃发酵参数及日粮营养物质消化率的影响[J].中国畜牧杂志,2012,48(9):56–59.

Effects of *Candida tropicalis* and Mulberry Leaf Flavonoids on Nutrient Metabolism and Rumen Fermentation of Calves

YANG Chuntao[1] DIAO Qiyu[1] QU Peibin[1] SI Bingwen[1] MA Junnan[1] ZHOU Yucai[2] TU Yan[1*]

(1. *Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing Key Laboratory for Dairy Cow Nutrition, Beijing* 100081, *China*; 2. *Beijing Capital Agribusiness Simplot Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Beijing* 100081, *China*)

---

*Corresponding author, professor, E-mail: tuyan@caas.cn

（责任编辑　王智航）

Abstract: This study was aimed to investigate the effects of *Candida tropicalis* (CT) and mulberry leaf flavonoids (MLF) on energy and nitrogen metabolism, rumen microbial protein synthesis and rumen fermentation of pre- and post-weaning calves. Forty-eight Chinese Holstein bull calves aged （20±2） days were used and assigned to one of the four groups with 12 calves each. The calves in the control group (CON group) were fed a basal diet which including a milk replacer and a starter in pre-weaning period and the starter in post-weaning period. Calves in CT, MLF and CM groups were fed the basal diet with CT, MLF and the compound of CT and MLF, respectively. The calves were weaned (milk replacer) at 56 days of age and the trial lasted 60 days. The rumen fluid was collected at 28, 42, 56 and 80 days of age, digestion trials were conducted to estimate nutrients metabolism at 35 and 63 days of age, respectively. The result showed as follows: comparing with CT group, metabolizable energy of pre-weaning calves in CM group was significantly higher (P<0.05); compared with CON group, the utilization of nitrogen of post-weaning calves in CM group was significantly increased (P<0.05); nitrogen biological value of pre-weaning calves in MLF group was significantly higher than that in CON and CT groups (P<0.05). Compared with CON group, rumen fluid pH (28 to 80 days of age) and microbial protein content (56 and 80 days of age) in CT group were significantly increased (P<0.05), but the concentration of ammonia nitrogen was not impacted by treatments (P>0.05); total volatile fatty acid concentration and butyrate content in MLF group were significantly higher than those in CON group at 56 days of age (P<0.05); there was an increasing tendency for acetate to propionate ratio in CT and MLF groups compared to that in CON group (P=0.090), and the contents of acetate and valerate were not affected （P>0.05）. In conclusion, the supplementation of CT can help to increase rumen fluid pH and microbial protein synthesis for pre-weaning calves; the supplementation of CT and MLF can increase metabolizable energy of diet and nitrogen biological value for pre-weaning calves, decrease fecal energy and total excrete nitrogen, improve metabolizability of gross energy and utilization of nitrogen of post-weaning calves. Furthermore, it also can improve rumen fermentation. Compared with the effects of single using, the combining of CT and MLF is preferable.

Key words: calf; *Candida tropicalis*; mulberry leaf flavonoids; microbial protein; nutrient metabolism; rumen fermentation